

Untersuchungen
zum qualitativen Nachweis und zur
quantitativen Bestimmung
von freiem Betanin im Serum

von

Michael V. Aiello

aus New York City

1965

1967 # 118



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Untersuchungen zum qualitativen Nachweis und zur
quantitativen Bestimmung von freiem Betanin im Serum

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Michael V. Aiello
aus
New York City

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan : Prof. Dr. W.-D. Keidel

Referent : Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt

Korreferent : Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung : 21.5.1965

Inhaltsverzeichnis

- I. Einleitung
- II. Problemstellung
- III. Eigene Untersuchungen
 - A. Gewinnung der Blut- und Harnproben von den Versuchspersonen
 - B. Versuche zur Bestimmung von Betanin im Serum
 - 1. säulenchromatographisches Verfahren
 - α) Das Verfahren für Harn nach M.-Th. Aiello
 - β) Anwendung auf Serum mit Betaninzusatz
 - 2. Farbreaktion mit Natronlauge
 - α) Farbreaktion im Harn
 - β) Anwendung der Reaktion auf Serum
 - 3. Methode zur Betaninbestimmung in enteiweißtem Serum
 - α) Betaninbestimmung im Serum nach Betaninzusatz
 - β) Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der Methode
 - γ) Untersuchung der Seren von Versuchspersonen
 - 4. Direkte spektrophotometrische Messung der Seren ohne Vorbehandlung
 - 5. Versuche zur Elimination der Oxyhämoglobin-Kurve
 - α) Reduktion mit Natriumdithionit
 - β) Entfernung des Hämoglobins durch Ausschütteln in essigsaurer Lösung
 - δ) Vorversuche
 - ββ) Versuche mit Betaninzusatz
 - 6. Optische Ausschaltung der Hämoglobin-Absorptionskurve

- α) Versuche mit Betaninzusatz
- β) Untersuchung der Seren von Versuchspersonen

- IV. Diskussion
- V. Zusammenfassung
- VI. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

Die Eigenschaft mancher Personen, nach Genuß von Roten Rüben (*Beta vulgaris*) einen hell- bis dunkelrot gefärbten Urin auszuscheiden, wird in der Literatur Betaninurie, Betacyaninurie oder Anthocyaniurie, im englischen Schrifttum häufig "beeturia" genannt.

Geldmacher- v. Mallinckrodt und Mendner (1965) konnten zeigen, daß es sich beim ausgeschiedenen roten Farbstoff tatsächlich um unverändertes Betanin handelte.

Das Phänomen der Betaninurie ist für die gerichtliche Medizin in mehrfacher Hinsicht interessant:

Der Nachweis des roten Farbstoffes im Harn kann zur Klärung der Frage beitragen, welche Mahlzeiten innerhalb eines gewissen Zeitabschnittes eingenommen wurden.

Daneben könnte u.U. der Farbstoffnachweis im Harn unbekannter Herkunft Hinweise auf einen bestimmten Personenkreis geben.

Weiter kommen in der forensisch-toxikologischen Praxis nicht selten Harne zur Untersuchung, die einen roten Farbton aufweisen, wodurch der Verdacht auf die Anwesenheit bestimmter Medikamente gelenkt wird. Hier könnte bei negativem Arzneimittel-, Hämoglobin- und auch Porphyrinnachweis eine befriedigende Erklärung für die Rotfärbung der Harnprobe gegeben werden

Gerichtsmedizinisch und auch klinisch wäre weiter daran zu denken, daß Ausscheider zu Simulationszwecken Rote Rüben gegessen haben, um einen pathologischen Harn vorzutäuschen.

Schließlich könnte bei Zutreffen des von mehreren Autoren (Allison und McWhirter 1956, Saldanha, Frota-Pessoa und Peixoto 1961) angenommenen rezessiven Erbganges für die

Ausscheider-Eigenschaft diese nach ausreichender Sicherung ein zusätzliches Untersuchungsverfahren zum Ausschluß einer Vaterschaft darstellen.

Nach Untersuchungen von Geldmacher- v. Mallinckrodt und Mendner ist jedoch der rezessive Erbgang noch keineswegs als gesichert anzusehen. Zumindest müßte der Begriff des "Nicht-ausscheiders" unter quantitativen Gesichtspunkten neu formuliert werden, da Geldmacher- v. Mallinckrodt und Mendner wie auch M.-Th.Aiello bei 74 untersuchten erwachsenen Personen nach Genuß von Roten Rüben stets Betanin, wenn auch in sehr unterschiedlicher Menge, im Harn nachwiesen.

M.-Th.Aiello konnte zeigen, daß bei ein und derselben Person die ausgeschiedene Menge und auch die Betaninkonzentration in außerordentlich weiten Grenzen schwanken, so daß eine Person, die an einem Versuchstag als starker Ausscheider einzuordnen war, an einem anderen Tag nur verschwindend geringe Betaninmengen ausschied. Daneben fand sie, daß das Maximum der Betaninausscheidung nach Genuß von Roten Rüben von Person zu Person sehr stark schwankte und etwa zwischen zwei und vier Stunden lag.

Zindler und Colovos sehen im Auftreten von Betanin im Harn den Ausdruck einer Nahrungsallergie.

Auch Watson, Luke und Inall (1963) halten das Phänomen der Betaninurie für weit komplexer, als es nach der einfachen genetischen Hypothese von Allison und McWhirter erscheint. Nach ihren Untersuchungsergebnissen schied bei Gabe von 100 g Roter Rüben 13,8% einer Normalbevölkerung Betanin im Urin aus, dagegen konnten sie eine Ausscheiderhäufigkeit von 48,6% bei Patienten mit Eisenmangelanämien und von 80% bei Personen im Eisenmangelzustand feststellen. Die zuletztgenannte Gruppe schied nach oraler Eisentherapie deutlich weniger Betanin aus, woraus die Autoren schließen,

daß Apoferritin eine Rolle bei dem Phänomen spielt. Sie halten es für möglich, daß die Betaninurie bei bestimmten Formen von "idiopathischer Enteropathie" auftritt.

Schon Laur (1949) war nach eingehenden klinischen, chemischen und bakteriologischen Untersuchungen der Ansicht, daß das Phänomen der Betaninurie nach Genuß von Roten Rüben in Abhängigkeit von den Resorptionsverhältnissen im Darmkanal auftrete. Laur nahm weiter an, daß Betanin harnfähig sei und ~~schellenlos~~ für die Niere ausgeschieden werde. Er injizierte ein betaninhaltiges Präparat in den großen Kreislauf verschiedener Patienten, um damit Darm und Leber zu umgehen. Danach konnte er etwa 70-80% des injizierten Farbstoffes im Harn wiederfinden. Aus diesen unter Umgehung des Darms gewonnenen Ergebnissen schließt er, daß weder eine Retention noch eine bevorzugte Eliminierung des Betanins durch die Niere erfolgt.

In einer bisher noch nicht erschienenen Arbeit injizierte auch Watson (1963) einem Menschen Betanin. Er fand gleichfalls 75% des injizierten Farbstoffes im Urin wieder. Auch er zieht daraus den Schluß, daß die unterschiedliche Ausscheidungsstärke hauptsächlich von der Absorption im Darm abhängt.

Entsprechende Tierversuche von Horwitt (1933), der die Ausscheidung der Anthocyane von Weintrauben untersuchte, sollen hier nicht berücksichtigt werden, da nach Arbeiten der Gruppe um Wilcox, Wyler, Mabry and Dreiding (1965) Betanin eine völlig andere Konstitution besitzt als die anderen Blütenfarbstoffe, die Anthocyane

II. Problemstellung

Um beim Nachweis von Betanin im Harn hieraus für forensische Fälle die richtigen Schlüsse zu ziehen, erschien es notwendig, die Ursache für eine Ausscheidung von Betanin

mit dem Harn weiter zu klären. Nach den aufgeführten Arbeiten konnte die Ausscheidung genetisch bedingt sein und damit für das einzelne Individuum eine konstante Eigenschaft aufweisen.

In diesem Falle könnten die Unterschiede in der Betaninausscheidung verursacht sein durch

1. genetisch bedingte Unterschiede in der Absorption
2. genetisch bedingte Unterschiede im Betaninabbau bzw. in der Betaninabbaugeschwindigkeit
3. durch eine genetisch bedingte gestörte Rückresorption in den Tubuli der Niere bei starken Ausscheidern.

Die meisten Ergebnisse sprechen allerdings dafür, daß für die unterschiedliche Ausscheidung die Resorption die Hauptrolle spielt, die durch die verschiedensten Faktoren - nicht nur genetische bei einfach rezessiv autosomalem Erbgang - gesteuert wird.

Nach den wenigen Untersuchungen, bei denen Betanin direkt, unter Umgehung des Darmes, in den Blutkreislauf gebracht wurde, scheint Betanin harnfähig zu sein und keine Nierenschwelle zu besitzen.

Um bei einem größeren Personenkreis Untersuchungen über Resorption und Ausscheidung durchführen zu können, erschien uns neben der Bestimmung der ausgeschiedenen Betaninmenge auch die Kenntnis der Höhe des Blutspiegels wichtig. Aus den Beziehungen zwischen ausgeschiedener Menge und Höhe des Blutspiegels erhofften wir weitere Einblicke in das Schicksal des Betanins zwischen Aufnahme und Ausscheidung zu gewinnen.

Über die Höhe des Blutspiegels nach Aufnahme betaninhaltiger Nahrung ist bisher nichts bekannt geworden. Wir führten deshalb Versuch durch mit dem Ziel, eine Methode zu finden, die in der Lage sein sollte, Betanin im Blut sowohl quali-

tativ nachzuweisen wie auch quantitativ zu bestimmen.

Bei allen Versuchen mit Serum wurden bei der gleichen Person parallel laufende Betaninbestimmungen im Harn nach der säulenchromatographischen halbquantitativen Methode von M.-Th. Aiello (1965) durchgeführt, um sicher zu sein, daß auch wirklich Betanin resorbiert wurde.

III. Eigene Untersuchungen

A. Gewinnung der Blut- und Harnproben von den Versuchspersonen.

Bei den Versuchen zur Bestimmung der Betaninkonzentration im Serum wurde stets in der folgenden Weise vorgegangen:

1. Die Versuchspersonen durften einen Tag vor dem geplanten Versuch keine fetten Speisen zu sich nehmen, um nicht das Serum durch Fett zu trüben.
2. Am nächsten Morgen wurde ihnen noch nüchtern Blut entnommen.
3. Darauf mußten sie innerhalb von 10 bis 15 Minuten 250 g gekochte Rote Rüben zu sich nehmen.
4. Vom Ende der Mahlzeit an wurde ihnen im Laufe von vier Stunden stündlich 10 ml Blut entnommen.
5. Etwa zur gleichen Zeit wurde der Harn gesammelt und mit der halbquantitativen Methode von M.-Th. Aiello darin die Betaninkonzentration festgestellt.

Hierbei wurde in der folgenden Weise vorgegangen:

Der stündlich gewonnene Harn wurde filtriert, die Menge notiert. Sodann wurde solange Harn durch eine mit Aluminiumoxyd sauer gefüllte Säule gegeben, bis sich der für Betanin charakteristische violette Ring deutlich sichtbar ausbildete. Die bis zu diesem Zeitpunkt durchgeflossene Harnmenge wurde festgestellt und notiert. Anhand

einer Eichkurve (gewonnen mittels Durchschicken eines mit verschiedenen, bekannten Betaninmengen versetzten Urins durch die Säule und Beobachten des Augenblickes, in dem sich ein deutlich sichtbarer, violetter Ring ausgebildet hat) wurden die ungefähren Betaninkonzentrationen in Gamma abgelesen. Die erhaltenen Werte wurden auf die Gesamtharnmenge umgerechnet.

6. Behandlung des Serums.

Das mit einer 15 ml Venüle entnommene Blut wurde sofort nach Entnahme in der Venüle 20 Min. bei einer Umdrehungszahl von 3000 Upm zentrifugiert. Durch anschließendes Absaugen kann man so etwa 5 ml Serum gewinnen, welches kaum hämolytisch erscheint.

B. Versuche zur Bestimmung von Betanin im Serum

1) Säulenchromatographisches Verfahren.

α) Das Verfahren für Harn nach M.-Th.Aiello

M.-Th.Aiello hatte ein Verfahren entwickelt, um Betanin aus Harn in einer Aluminiumoxydsäule anzureichern und nach anschließender Elution quantitativ zu bestimmen. Diese Methode lehnt sich an Angaben von Köhler (1953), Cramer (1953) und Mendner (1965) an.

Bei ihr wird von dem Harn von Versuchspersonen ausgegangen, die zunächst Leerharn sammeln und sofort darauf 250 g rohe oder gekochte Rote Rüben zu sich nehmen und die nächsten Harnproben zur Untersuchung bringen. Der Harn wurde filtriert und 20 ml hiervon durch eine mit saurem Aluminiumoxyd (Giulini) mindestens 10 cm hoch gefüllte Säule von 8 mm lichter Weite gegeben. Das im Harn enthaltene Betanin reichert sich in der Säule unterhalb der sich braun-gelb absondernden Harnpigmente in Form einer rot-violetten Zone an, die langsam nach unten wanderte. Nach Durchlauf der zum Versuch eingesetzten Harnmenge werden die braun-gelben Harnpigmente grobmechanisch entfernt, ohne die violette Betaninzone zu zerstören. Sodann wird zweimal mit einem Gemisch von 10 ml Chloroform und 2 ml Eis-

essig ausgewaschen, wobei die Harnfarbstoffe weitgehend entfernt werden, während die violette Betaninzone unbeeinflusst bleibt. An das Trockensaugen der Säule schließt sich die Elution der Betaninzone durch ein Gemisch von 6 n HCl und Methanol im Mischungsverhältnis 1:1 an. Die eluierte Lösung kann bei hinreichender Betaninkonzentration spektrophotometrisch gemessen werden, das Absorptionsmaximum des Betanin liegt bei 538 nm (s. Seite 15). Die erhaltenen Werte werden anhand einer Betanin-Eich-Kurve auf Betanin umgerechnet. Für die spektrophotometrischen Messungen wurde ein selbstregistrierendes Spektralphotometer Modell DK 2 der Fa. Beckman Instruments verwendet.

B) Anwendung auf Serum mit Betaninzusatz.

Wir versuchten zunächst die für den Harn beschriebene Methode auf Serum zu übertragen. Hierbei mußten wir jedoch feststellen, daß die Durchlaufzeit selbst für geringe Serummengen wie z.B. 3 ml mehrere Stunden betrug.

Entsprechende Versuche führten wir mit verschiedenen anderen Absorptionsmitteln, nämlich Aluminiumoxyd basisch mit der Aktivitätsstufe I und II sowie Aluminiumoxyd neutral mit der Aktivitätsstufe I und II der Fa. Giuliani wie auch mit Säulen von geringerer lichter Weite durch. Keine der geprüften Anordnungen war für unsere Zwecke geeignet. Es konnte in keinem Falle ein Passieren des Serums in einer befriedigend kurzen Zeit erreicht werden.

2) Farbreaktion mit Natronlauge

In Vorversuchen, in denen wir in der auf Seite 8 beschriebenen Weise Versuchspersonen nach einer Roten Rüben Mahlzeit Blutproben entnommen hatten, stellten wir in dem Serum einen rötlichen Farbton fest. In der Hoffnung, daß dieser Farbton Betanin zuzuschreiben sei, suchten wir in der Literatur einen leicht anwendbaren, für Be-

tanin spezifischen Test. Die in der Literatur angegebenen Farbreaktionen (Ainley und Robinson 1937, Schudel 1918, Pucher, Curtis und Vickery 1938, Reznik 1956, Schmidt, Becher und Hübner 1960) sind größtenteils unspezifisch. Lediglich die Eigenschaft des Betanins, im alkalischen Milieu einen gelben Farbton anzunehmen und bei Ansäuern wieder rot zu werden (die Ainley und Robinson sowie Köhler bereits beobachtet hatten) wurde von Watson Luke und Inall (1963) sowie von Mendner (1965) zu einer relativ empfindlichen Schnellreaktion auf Betanin ausgearbeitet:

α) Farbreaktion im Harn

Etwa 5 ml Ausscheiderharn werden mit wenigen Tropfen einer Natronlauge (6 n) versetzt. Die Farbe schlägt sofort nach Zintronengelb um, eine leichte Flockung tritt auf. Bei Zugabe von konzentrierter Salzsäure bis zu sauren Reaktion verschwindet die Flockung und der Urin färbt sich wieder rot.

β) Anwendung der Reaktion auf Serum

Um diese Reaktion auch zur Serumuntersuchung verwenden zu können, mußten die Bedingungen variiert werden, da sowohl der Zusatz starker Lauge, als auch der Zusatz von konzentrierter Salzsäure zu Eiweißveränderungen und z.T. zu starken Ausflockungen geführt hätte.

Um die richtigen Bedingungen zu finden, versetzten wir Serum mit wenig Betaninlösung bis zur schwachen Rotfärbung. Wir konnten feststellen, daß schwaches Alkalisieren mit 2 n Natronlauge die Rotfärbung zum Verschwinden brachte und schwaches Ansäuern mit 1 n Salzsäure Serumeiweiß noch nicht ausfällte, jedoch den roten Farbton wieder hervorbrachte. Die Reaktion wurde in der folgenden Weise durchgeführt:

1 ml Serum wurde unter ständiger Kontrolle des pH-Wertes mit dem Universalindikatorpapier Merck mit sowie

2 n Natronlauge versetzt, bis eine eben alkalisiche Reaktion auftrat. Bei Anwesenheit von Betanin schlug die Farbe sofort in zitronengelb um. Darauf wird soviel 1 n HCl zugegeben, bis eine saure Reaktion auftritt. Bei Anwesenheit von Betanin schlägt die Farbe sofort annähernd in die anfängliche Rotfärbung zurück.

Bei Durchführung dieser Reaktion mit hämolytischen Nüchternserum (keine Rote Rüben-Aufnahme) trat bei Zugabe der Lauge kein Umschlag der Farbe in zitronengelb auf, vielmehr blieb der Farbton der Lösung während des Alkalisierens und Wiederansäuerns praktisch gleich.

Anschließend wurde dieselbe Reaktion mit Seren von Versuchspersonen durchgeführt, die etwa 1 Stunde nach einer Rote Rüben-Mahlzeit gewonnen worden waren, und die einen deutlich roten Farbton aufwiesen. Nach Zusatz der Natronlauge konnte jedoch keine zitronengelbe Färbung erkannt werden. Das Serum der Versuchspersonen verhielt sich wie hämoglobinhaltiges hämolytisches Serum. Damit dürfte der rötliche Farbton im Serum unserer Versuchspersonen durch Hämolyse bedingt gewesen sein. Falls sich doch Betanin in den Versuchsseren befand, war es entweder in einer zu geringen Menge vorhanden, um eine positive Reaktion zu liefern oder es lag in gebundener Form im Serum vor.

3. Methode zur Betaninbestimmung in enteiweißtem Serum

Da einerseits die Eigenfarbe des Serums und ein evtl. vorhandener Hämoglobingehalt eine Rotfärbung durch Betanin überdecken konnte und da es andererseits möglich war, daß Betanin nicht in völlig freier Form im Serum vorlag, sondern z.B. an Eiweiß gebunden war, führten wir Versuche zur Betaninbestimmung im Serum nach Ent-

eiweißung durch, wobei als zusätzlicher Vorteil möglicherweise eine etwa vorhandene Betanin-Eiweißbindung gelöst werden konnte. Zur Eiweißfällung verwendeten wir Trichloressigsäure, die häufig Anwendung findet, um ein eiweißfreies Filtrat zur Analyse zu gewinnen.

a) Betaninbestimmung im Serum nach Betaninzusatz.

Vor Beginn der Versuche mit Probandenserum führten wir einige orientierende Versuche mit einem frischen Nüchternserum ohne Rote-Rüben-Genuß durch, dem wenig Betaninlösung bis zur schwachen Rotfärbung zugesetzt worden war.

Frisches Serum wurde in zwei gleiche Teile geteilt. Zu beiden Anteilen wurden je 25 γ Betanin in wenig Wasser gegeben. Daraufhin wurde in dem einen Anteil das im Serum befindliche Eiweiß sofort durch Zusatz der gleichen Menge 20%iger Trichloressigsäure ausgefällt. Nach Zentrifugieren wurde die überstehende Flüssigkeit spektrophotometrisch untersucht. Der zweite Serumanteil wurde in der gleichen Weise behandelt, aber erst nach zweistündigem Stehen, um hiermit auch beim Stehen erfolgende Veränderungen zu erfassen.

Im enteiweißten Serum konnten wir nach Zusatz der genannten Betaninmenge in der überstehenden Flüssigkeit stets einen rötlichen Farbton beobachten. Nach dem Ergebnis der spektrophotometrischen Untersuchung handelte es sich hierbei um Betanin. Hiermit schien eine Methode gegeben, die es erlaubte, Betanin im Serum ohne Störung durch einen Hämoglobingehalt zu bestimmen. Es war nun noch erforderlich, die Nachweisgrenze dieser Methode zu bestimmen.

B) Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der Methode.

Wir führten die folgenden Versuche durch:

Dem frischgewonnenen Serum einer nüchternen Versuchsperson, die keine Roten Rüben gegessen hatte, wurde

eine kleine Menge einer wässrigen Betaninlösung zugesetzt, so, daß auf 1,5 ml Serum Betaninmengen von 25 γ abwärts entfielen. Die Serumproben wurden in der bereits beschriebenen Weise aufgearbeitet und der Betaningehalt spektrophotometrisch bestimmt. Es zeigte sich, daß noch die Anwesenheit von 6,6 γ Betanin in 1 ml Serum zu bestimmen war. Geringe Mengen waren nicht mehr nachweisbar.

γ) Untersuchung der Seren von Versuchspersonen.

Hierauf wurden entsprechende Versuche mit den Seren von 10 Versuchspersonen durchgeführt. Diese hatten in der auf Seite 8 beschriebenen Weise Rote Rüben aufgenommen, und es wurde ihnen vier Mal danach in Abständen von je etwa 1 Stunde Blut abgenommen. Alle diese Personen hatten während dieser Zeit Betanin im Harn ausgeschieden. Bei Aufarbeitung der Serumproben nach Enteiweißung konnten wir allerdings keinen roten Farbton feststellen. Somit lag die Betaninkonzentration in den untersuchten Serumproben - falls überhaupt freies Betanin vorhanden war - niedriger als 6,6 γ /ml.

4. Direkte spektrophotometrische Messung der Seren ohne Vorbehandlung.-----

Da unter Umständen die Nachweisgrenze der Betaninbestimmungsmethode nach Enteiweißung mit 6,6 γ /ml noch zu hoch lag, versuchten wir ein empfindlicheres Verfahren auszuarbeiten. Ein solches könnte z.B. erreicht werden, wenn die durch die Enteiweißung unumgängliche Verdünnung des Serums nicht erforderlich wäre.

Bei den im Vorstehenden beschriebenen Versuchen hatte es sich als praktisch unmöglich erwiesen, geringe Betaninmengen neben einem Hämoglobingehalt des Serums festzustellen, da das Absorptionsmaximum einer wässrigen Betaninlösung nach Robinson und Robinson (1932),

Reznik (1956 und 1957), sowie Wyler und Mitarbeiter (1959) II bei 538 nm liegt, Hämoglobin aber zwei Absorptionsmaxima bei 576 nm (sog. Alphabande) und 541 nm (Betabande) aufweist. Dazwischen befindet sich ein Minimum bei 560 nm. Danach fällt die Betabande des Hämoglobins mit dem Absorptionsmaximum des Betanins praktisch zusammen. Ein Hämoglobingehalt des Serums kann daher sehr leicht geringe Betaninmengen überdecken.

Die Extinktion der Alpha- und der Betabande liegt für ein und dieselbe Hämoglobinkonzentration annähernd in gleicher Höhe. Bei der spektrophotometrischen Untersuchung von Hämoglobinhaltigem Serum, dem größere Mengen von Betanin zugesetzt waren, zeigte sich, daß die Extinktion im Bereich der Betabande wesentlich größer war als diejenige der Alphabande. Der auf das Betanin zurückführende Extinktionsanteil war der Betabande des Hämoglobins gleichsam wie eine Kappe aufgesetzt.

Wurden diese Seren nach Trichloressigsäurezusatz spektrophotometrisch untersucht, so ergab sich die Absorptionskurve des reinen Betanin mit einem Maximum bei 538 nm.

Auf Grund dieser Ergebnisse war es naheliegend, ein frisches, betaninhaltiges - wenn auch schwach hämoglobinhaltiges - Serum ohne weitere Vorbehandlung spektrophotometrisch zu untersuchen und so unter Umständen ohne eingreifende Maßnahmen und Verdünnung den Betaningehalt festzustellen.

α) Zusatzversuche

Wir gingen in der folgende Weise vor:

Das leicht hämolytische Serum einer Versuchsperson, die keine Roten Rüben zu sich genommen hatte, wurde spektrophotometrisch untersucht. Dabei wurde die für Oxyhämoglobin typische Absorptionskurve mit

einer Extinktion von etwa 0,5 für beide Maxima festgestellt. Zu diesem Serum wurde sodann wässrige Betaninlösung in steigender Menge zugesetzt. Die mit Betanin versetzten Serumproben wurden wiederum spektrophotometrisch untersucht, und die jeweilige Erhöhung der Extinktion bei 540 nm in Abhängigkeit von der zugesetzten Betaninmenge notiert.

Es zeigte sich, daß bei größerem Betaninzusatz aus der Extinktionzunahme bei 540 nm ein gewisser Rückschluß auf die Betaninmenge gezogen werden konnte. Hämolytische Seren ein und derselben Versuchsperson, die zu verschiedenen Zeiten entnommen worden waren, zeigten aber so große Unterschiede in dem Verhältnis E_{576} nm zu E_{541} nm, daß in dem Bereich der bei unseren Versuchen zu erwartenden geringen Betaninmengen hier eine sichere Bestimmung nicht möglich erschien.

5. Versuche zur Elimination der Oxyhämoglobinkurve.

Nach unseren bisherigen Versuchsergebnissen stand der nötigen Empfindlichkeit der Betaninmessung im Serum das stets in geringer Menge im Serum gelöste Hämoglobin im Wege.

a) Reduktion mit Natriumdithionit.

Da eine besondere Schwierigkeit darin lag, Betanin mit seinem Absorptionsmaximum bei 538 nm neben der Betabande des Hämoglobins (541 nm) zu bestimmen, lag der Gedanke nahe, durch Reduktionsmittel das Oxyhämoglobin in reduziertes Hämoglobin zu verwandeln, welches eine Absorptionskurve mit einem einzigen Maximum bei 555 nm besitzt. Die Reduktion mußte so erfolgen, daß anwesendes Betanin nicht verändert und das Serumeiweiß nicht beeinträchtigt würde, so daß anschließend eine spektrophotometrische Messung erfolgen konnte. Als Reduktionsmittel wurde Natriumdithionit gewählt:

Wir setzten 3 ml eines leicht hämolytischen Serums, bei dem die Extinktion bei 541 bzw. 576 nm etwa 0,5 betrug, Betanin in einer Menge von 10 γ /ml zu. Die Absorptionskurve dieser Serumprobe wurde aufgenommen. Es ergab sich, wie zu erwarten, bei 541 nm eine deutlich höhere Extinktion als bei 576 nm. Sodann wurde eine kleine Spatelspitze Natriumdithionit dazugefügt und umgeschüttelt. Die hiernach aufgenommene Absorptionskurve zeigte ein Maximum bei etwa 555 nm. Die Kurve besaß jedoch eine derartig breite Basis, daß die Absorptionskurve des Betanin mit ihrem Maximum bei 538 nm hierin immer noch maskiert war.

Da die Möglichkeit nicht auszuschließen war, daß Betanin durch das Reduktionsmittel beeinträchtigt wird und die angestrebte Empfindlichkeit nicht zu erreichen war, gaben wir weitere Versuche in dieser Richtung auf.

- β) Entfernung des Hämoglobins durch Ausschütteln in essigsaurer Lösung.

αα) Vorversuche.

Hämoglobin kann nach Zusatz von Eisessig, wobei Umwandlung in Hämin eintritt, mit Äther extrahiert werden.

Wir führten Versuche in dieser Richtung durch. Um Veränderungen des Serumeiweißes bei der Eisessigzugabe möglichst niedrig zu halten, mischten wir den Eisessig mit Äther, bevor er dem Serum zugesetzt wurde. Aus dem gleichen Grunde führten wir eine Reihe von Versuchen durch, um das richtige Verhältnis Eisessig : Äther zu finden, das einerseits noch genügend Eisessig enthielt, um das geringe Hämoglobin in Hämatin umzuwandeln, und andererseits auch genug Äther um das Hämin völlig zu extrahieren.

Es stellte sich heraus, daß eine Mischung von 0,5 ml Eisessig in 20 ml Äthern zur Entfernung des Hämoglobins aus 3 ml Serum geeignet war. Um während des Ausschüttelns die Bildung von Emulsionen zu vermeiden, war es notwendig, das Eisessig-Äthergemisch dem Serum langsam zuzusetzen und sodann sorgfältig etwa 20mal hin- und herzukippen. Zehnmaliges Hin- und Herkippen reichte nicht aus, daß gesamte Hämoglobin zu entfernen, wohingegen bei 50maligem Kippen eine Emulsionsbildung nicht zu umgehen war. Nach der Extraktion wurde das Serum-Äthergemisch 15 Minuten lang bei einer Tourenzahl von 3000 Upm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren hatte sich der Äther von dem Serum gut abgetrennt. Nach Abgießen der Ätherschicht durchstießen wir vorsichtig eine zwischen beiden Phasen ausgebildete Eiweißscheibe mit einer Glaskapillare und saugten dann das Serum zur spektrophotometrischen Bestimmung heraus.

Wir behandelten mit dieser Mischung 20 hämolytische Seren, die wir von verschiedenen Versuchspersonen gewonnen hatten, und konnten nach der Behandlung spektrophotometrisch feststellen, daß das gesamte Hämoglobin entfernt war.

BB) Versuche mit Betaninzusatz.

In weiteren Versuchen prüften wir die Möglichkeit der Betaninbestimmung in schwach hämolytischen Seren, aus denen das Hämoglobin mittels Ätherextraktion aus essigsaurer Lösung entfernt worden war. Es zeigte sich, daß Betanin von dem Extraktionsschritt nicht angegriffen wird und nach Abtrennung des extrahierten Serums spektrophotometrisch bestimmt werden kann. Als untere Grenze ließ sich Betanin noch in einer Serumprobe nachweisen, die 22 γ Betanin in 1 ml enthielt. Damit erreichte dieses Verfahren nicht einmal die Nach-

weisgrenze der Betaninbestimmung nach Trichlor-essigsäureentseiwung. Es erschien, obwohl Hä-moglobin zuverlässig entfernt werden konnte, für unsere Untersuchungen als zu wenig empfindlich.

6. Versuch einer optischen Ausschaltung der störenden
Hämoglobinabsorptionskurve.-----

Bei allen bisher beschriebenen spektrophotometrischen Untersuchungen wurden die Seren, welche das Lösungsmittel darstellten, in dem die zu messende Substanz wie etwa Hämoglobin und Betanin gelöst enthalten waren, gegen Wasser als reines Lösungsmittel gemessen. Diese Wahl brachte schon insofern gewisse Schwierigkeiten mit sich, als die Betanin-Absorptionskurven im Serum - bedingt durch die unvermeidliche leichte Trübung derselben - nicht bei der Extinktion null, sondern bei einem höheren Extinktionswert begannen.

Für die künftigen, spektrophotometrischen Messungen entschlossen wir uns zunächst, als Leerwert reines Serum zu verwenden, d.h. frisch gewonnenes Serum einer Versuchsperson, die noch keine Roten Rüben aufgenommen hatte. Dadurch wollten wir erreichen, daß die spektrophotometrisch faßbaren Unterschiede der gegeneinander gemessenen Lösungen sich stärker gegenseitig aufhoben, als es bei den Messungen gegen Wasser als Leerwert möglich war. Allerdings war auch hier nicht zu vermeiden, daß das als Leerwert verwendete Nüchternserum geringe Hämoglobinspuren enthielt, deren Menge von Mal zu Mal selbst bei ein und derselben Person schwankte. Der Oxyhämoglobingehalt des als Leerwert dienenden Serums wurde nun vorher stets durch eine Messung gegen Wasser als Leerwert festgestellt. Lag zufällig der Oxyhämoglobingehalt in dem als Leerwert dienenden Serum und in der zu untersuchenden Probe in gleicher Höhe, so ergab sich als registrierte Absorptionskurve eine gerade Linie, d.h. die beiden Oxyhämoglobinabsorptionskurven kompensierten sich

gegenseitig. Wir versuchten nun diesen Effekt für eine empfindliche Betaninbestimmung selbst in leicht hämolytischen Seren ohne weitere Behandlung nutzbar zu machen. Lag der Hämoglobingehalt des zu messenden und des als Leerwert dienenden Serums nicht auf gleicher Höhe, so war es möglich, durch Zusatz kleiner Mengen einer Oxyhämoglobininlösung beide Lösungen auf gleichen Oxyhämoglobingehalt zu bringen.

Zur Herstellung der Oxyhämoglobininlösung wurde das frisch entnommene Blut einer Versuchsperson zentrifugiert. Das Serum wurde abgetrennt, der Bodensatz von roten Blutkörperchen durch Zusatz von wenig Wasser und kräftigem Schütteln hämolysiert. Sodann wurde wieder zentrifugiert und die überstehende Lösung für die Zusätze verwendet.

Bei folgerichtiger Anwendung des Kompensationsprinzipes für die Oxyhämoglobinkurve war zu erwarten, daß auch in hämoglobinhaltigem Serum ein Betaningehalt durch eine Absorptionskurve mit einem einzigen deutlichen Maximum bei 538 nm festzustellen war, wobei dieses Maximum ausschließlich auf Betanin zurückzuführen war. Darauf konnte eine quantitative Betaninbestimmungsmethode anhand einer aufgestellten Eichkurve aufgebaut werden.

a) Versuche mit Betaninzusatz

Wir führten also nunmehr Versuche mit Betaninzusatz durch. Hierbei gingen wir so vor, daß wir zu einem leicht hämolytischem Serum in absteigender Menge wenig Betanininlösung bekannten Betaningehaltes gaben. Diese Serumproben sowie die als Leerwert dienende reine Serumprobe ohne Betaninzusatz wurden zunächst alle gegen Wasser als Leerwert gemessen. Aus den aufgenommenen Absorptionskurven ließ sich ein Anhaltspunkt über den jeweiligen Hämoglobingehalt der Proben gewinnen. Sodann wurde durch Zusatz von wenig Hämoglobininlösung der Hämoglobingehalt der einzelnen Proben einander angeglichen, was im allgemeinen nach 2-3maligem Zusatz und anschließender Messung gegen Wasser erreicht

war. Anschließend konnten die Betanin enthaltenden Serumproben gegen das in etwa gleicher Konzentration hämoglobinhaltige Leerserum gemessen werden. Es ergab sich bis zu einer Betaninkonzentration von 3γ /ml bei der Messung die Absorptionskurve des reinen Betanins mit einem Absorptionsmaximum bei 538 nm. Die in einer Eichkurve eingetragenen Extinktionswerte lagen auf einer Linie. Die Eichkurve entsprach in ihrer Neigung derjenigen einer Eichkurve, die durch Verdünnen einer wässrigen Betaninlösung gewonnen worden war.

Vergleicht man die bei dieser Methode gegebene Empfindlichkeit (Nachweisgrenze 3γ Betanin/ml) mit derjenigen der anderen im vorstehenden geschilderten Methoden, so ist sie unzweifelhaft die empfindlichste. Daneben ist sie am schnellsten durchführbar, erfordert die wenigsten zusätzlichen Handgriffe und verlangt darüberhinaus keine Eingriffe, die die Gefahr mit sich brächten, daß entweder durch Veränderungen des Eiweißes Flockung und Trübung auftreten, was die Messung unmöglich machen würde, oder daß am Betaninmolekül Veränderungen eintreten könnten.

8) Untersuchung der Seren von Versuchspersonen.

Wir untersuchten deshalb mit dieser Methode Serumproben von 10 Versuchspersonen, die Rote Rüben in der auf Seite 8 beschriebenen Weise zu sich genommen hatten und von denen anschließend Blut und Harnproben genommen worden waren. Unter diesen 10 Personen waren 4, die hierbei im Harn viel Betanin und 3 Personen, die im Harn mittelmäßige Betaninmengen ausschieden, sowie 3 Personen, die nur schwache Betaninausscheider waren.

Die Untersuchung der Serumproben erfolgte direkt spektrophotometrisch in der auf Seite 19 beschriebenen Weise nach entsprechendem Hämoglobinzusatz. In jedem Fall

gelang es, die Oxyhämoglobinabsorptionskurve völlig zu kompensieren. Die von dem selbstregistrierenden Spektralphotometer aufgeschriebene Kurve entsprach weitgehend einer horizontalen Linie. Ein Absorptionsmaximum insbesondere im Bereich um 538 nm konnte nicht festgestellt werden.

Die Untersuchung der Harnproben erfolgte nach der Methode von M.-Th. Aiello (siehe Seite 8). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß z.T. beträchtliche Betaninmengen pro Stunde ausgeschieden wurden. Trotzdem konnte bei keiner der Versuchspersonen im Serum Betanin festgestellt werden.

IV. Diskussion

Wir konnten ein Meßverfahren zur Bestimmung von Betanin im Serum angeben, daß in der Lage war, noch $3 \gamma/\text{ml}$ freies Betanin im Serum zu erfassen. Mit dieser Methode war bei zehn Versuchspersonen die nach Rote-Rüben-Genuß über 5 Stunden Betanin im Harn in einer Konzentration von $0,85 - 5,85/\text{ml}$ im Mittel also von $2,698/\text{ml}$ ausschieden, kein Betanin im Serum nachzuweisen. Damit dürfte der Betaninspiegel im Blut bei starken und mittelstarken Ausscheidern unter $3 \gamma/\text{ml}$, d.h. unter $3000 \gamma/\text{l}$ ($3000 \gamma/\%$) liegen.

Auch theoretische Überlegungen führen zu der Annahme, daß nach Rote-Rüben-Aufnahme Betanin in einer geringeren Konzentration als $3 \gamma/\text{ml}$ im Blut vorkommt:

1. Gewöhnlich wird eine Substanz, die im Blute gelöst vorliegt, durch die Glomeruli filtriert und durch die Tubuli teilweise rückresorbiert. Da Wasser in einem viel größeren Ausmaß als die meisten im Blut gelösten Substanzen rückresorbiert wird, ist die Konzentration von Substanzen im Urin meist höher als ihre Konzentration im Blut. Da die höchste Betaninkonzentration, die wir im Harn feststellen konnten (siehe Tabelle 1) kaum $3 \gamma/\text{ml}$

T a b e l l e 1

	Per- so- nen	1,5 Stunde		Zeit nach Rote 2 Stunde		Rüben Aufnahme 3 Stunde		4 Stunde	
		Gesamt Beta- nin in	Betanin γ/ml	Gesamt Beta- nin in	Betanin γ/ml	Gesamt Beta- nin in	Betanin γ/ml	Gesamt Beta- nin in	Betanin γ/ml
-Beta- nin in der je- weils ausge- schie- denen Harn- menge	A	297	2,70	270	3,00	137,5	2,50	-	-
	B	31,25	1,25	75	2,50	67,5	2,70	67,5	2,70
	C	245	1,75	255	4,25	536	3,60	262,5	2,50
	D	146	2,25	108	3,00	67,5	2,70	97,5	1,90
	E	115,5	2,10	607,5	3,75	456,0	3,00	150,0	3,00
	F	157,5	2,25	351,0	5,85	316,25	5,85	544,5	4,95
	G	157	2,10	262,5	2,50	297,0	2,70	233,0	-
	H			210,0	2,10	115,5	2,10	67,0	2,50
	I			68,0	0,85	87,5	1,75	75,0	2,50
	J			148,5	2,70	121,5	2,70	131,75	1,75
-Beta- nin im Serum	al- le Per- sö- nen	nicht festellbar		nicht festellbar		nicht feststellbar		nicht festellbar	

Durchschnitt = 2,69γ /ml

überschreitet, kann man nach den üblichen Verhältnissen erwarten, daß die Betaninkonzentration im Blut weit unter $3 \gamma/\text{ml}$, der untersten Nachweisgrenze unserer empfindlichsten Methode zur Erfassung von Betanin im Serum, liegt.

2. Selbst wenn man annimmt, daß Betanin, welches äußerst wasserlöslich ist (Köhler 1953) durch die Tubuli in demselben Ausmaß wie Wasser rückresorbiert wird, nämlich im Durchschnitt zu 99,4% (West und Todd 1956) so ist im Blut eine Betaninkonzentration von weniger als $3 \gamma/\text{ml}$ zu erwarten, wie aus den folgenden Überlegungen hervorgeht:

Die Niere wird in einer Minute von etwa 1070 ml Blut durchströmt (Rein-Schneider 1960), in einer Stunde also von 64.2 l.

Nimmt man nun an, daß $607,5 \gamma$ Betanin (höchste ausgeschiedene Gesamtbetaninmenge im Harn einer Versuchsperson während einer Stunde) nur 0,6% der gesamten während einer Stunde im Blut durch die Niere geflossene Betaninmenge sind, dann kann man, da 99,4% des Betanins rückresorbiert worden sind, die rückresorbierte Betaninmenge zu 60385,5 errechnen. Danach wären in 64,2 ltr. Blut (die in einer Stunde die Niere durchströmt haben) $60385 \gamma + 607,5 \gamma = 60993 \gamma$ Betanin enthalten gewesen, d.h. Betanin hätte in einer Konzentration von $0,95 \gamma/\text{ml}$ vorgelegen. Dies stellt eine Konzentration dar, die noch unter der Nachweisgrenze unserer spektrophotometrischen Methode zur Bestimmung von Betanin im Serum ($3 \gamma/\text{ml}$) liegt.

Treffen die Vermutungen von Watson, Luke und Inall (1963) zu, so ist Betanin während der Resorption und des Transportes an Eiweiß gebunden. Er fand Zusammenhänge zwischen Eisenmangelanämien und der Ausscheidung von Betanin in dem Sinne, daß bei Eisenmangel, in dem ein Teil des Apoferritin unausgenützt vorlag, die Betaninausscheidung nach Rote-Rüben-Genuß wesentlich stärker war, als bei

gesunden Personen. Bei Eisengaben nahm die Betaninausscheidung deutlich ab. Die Autoren deuten dies so, daß die Betaninurie während der Zeit eines "Eisenhungers" auftritt und der Weg der Eisenresorption für die Aufnahme des Betanins benützt wird. Hierbei halten sie es für möglich, daß Eisen und Betanin in einer kompetitiven Beziehung zu einer Akzeptor-Substanz stehen, wobei Eisen über eine bevorzugte Stellung verfügt.

Diesen Akzeptor stellt für die normale Eisenresorption durch die Darmwand der eisenfreie Eiweißkörper Apoferritin dar, welcher durch Anlagerung von Eisen als Fe III zu Ferritin wird, das für Resorption, Transport und Speicherung des Eisens eine bedeutsame Rolle spielt. Solange Apoferritin noch nicht mit Eisen gesättigt ist, wird Eisen von der Darmschleimhaut aufgenommen. Ist alles Apoferritin in Ferritin überführt, so stoppt die Eisenresorption, weil nun kein Konzentrationsgefälle mehr besteht (Lehnhartz 1959). Nach Watson, Luke und Inall würde innerhalb der physiologischerweise fluktuierenden Eisenresorption bei gesunden Personen und ganz besonders dann, wenn Eisen hunger besteht, wie dies bei Eisenmangelkrankungen der Fall ist, Apoferritin nicht vollkommen abgesättigt sein, so daß der ungesättigte Teil zur Resorption von Betanin zur Verfügung stand.

Unsere Versuche zur Betaninbestimmung im Serum nach Enteiweißung hatten z.T. das Ziel, etwa an Eiweiß gebundenes Betanin in Freiheit zu setzen und damit zu erfassen. Da die Nachweisgrenze dieses Meßverfahrens aber etwa bei $6 \gamma/\text{ml}$ lag, wäre bei dem zu vermutenden niedrigen Blutspiegel auch an gebundenes Betanin die geringen freigegebenen Betaninmengen dem Nachweis entgangen.

Führt man sich nämlich vor Augen, daß die normale Eisenkonzentration im Serum 1 bis $1,4 \gamma/\text{ml}$ beträgt, und daß hierdurch ein erheblicher Teil des Apoferritin besetzt ist unter Bildung von Ferritin, so müßte an Apoferritin

gebundenes Betanin in wesentlich niedrigerer Konzentration als 3 γ /ml im Serum liegen.

Auch die signifikante Zunahme der Konzentration des Transferrins, eines lockeren Eisen-Eiweißkomplexes, der zum Transport des Eisens nach der Resorption in der Darmwand dient, in Eisenmangelzuständen (Harper 1957) könnte als Stütze für die Hypothese von Watson, Luke und Inall angenommen werden. Transferrin wäre dann u.U. der Eiweißkörper, der den Transport des Betanins im Blut übernimmt. Ein eindeutiger Beweis für einen Zusammenhang zwischen Eisenresorption und -transport, sowie der Betaninaufnahme ist noch nicht erbracht.

V. Zusammenfassung

Das Phänomen der Betaninurie ist in verschiedener Hinsicht für die gerichtliche Medizin interessant:

Bei Zutreffen des angenommenen Erbganges könnte es nach ausreichender Sicherung ein neues Untersuchungsverfahren zum Vaterschaftsausschluß darstellen.

Der Nachweis des roten Farbstoffes im Harn kann zur Klärung der Frage beitragen, welche Mahlzeiten innerhalb eines gewissen Zeitabschnittes eingenommen wurden. Daneben könnte der Farbstoff-Nachweis im Harn unbekannter Herkunft Hinweise auf einen bestimmten Personenkreis geben. In der forensisch-toxikologischen Praxis kommen oft Harn zur Untersuchung, die einen roten Farbton aufweisen, wodurch der Verdacht auf die Anwesenheit bestimmter Medikamente gelenkt wird. Hier könnte bei negativen Arzneimitteln-, Hämoglobin- und auch Porphyrin-Nachweis eine befriedigende Erklärung für die Rotfärbung der Harnprobe gegeben werden. Gerichtsmedizinisch und auch klinisch wäre schließlich daran zu denken, daß Ausscheider zu Simulationszwecken Rote Rüben essen, um einen pathologischen Harn vorzutäuschen.

Unsere Aufgabe war es gewesen, eine Methode zu entwickeln, mit der wir das Betanin im Serum sowohl qualitativ wie auch quantitativ nachzuweisen imstande sind. Wir haben dazu sechs verschiedene Wege, die in der Tabelle 2 eingetragen sind, eingeschlagen. Diese von uns angestrebte Methode sollte im Rahmen der durchgeführten Versuche zur Klärung des Mechanismus des noch relativ wenig geklärten Phänomens der Betaninurie beitragen. Wir hofften, daß sich die Fragen der Betaninresorption vom Darn, der Abbaugeschwindigkeit des Betanins oder die Frage einer gestörten Rückresorption in den Tubuli der Niere bei starken Ausscheiden vielleicht beantworten lassen, wenn es uns gelingt, den Blutspiegel des Betanins nach Genuß von Roten Rüben zu bestimmen (M. Geldmacher- v. Mallinckrodt 1963).

Alle Ergebnisse, die wir im Verlauf von 40 Versuchen an zehn verschiedenen Personen gesammelt haben, deuten daraufhin, daß freies Betanin nach Rote-Rüben-Aufnahme im Serum in einer Konzentration unter $3 \gamma/\text{ml}$ vorliegen muß; ein Wert, der die unterste Grenze unserer besten Betaninbestimmungsmethode darstellt. Auch nach Genuß von einer großen Menge an Roten Rüben, die weit über der Menge liegt, die eine Person freiwillig zu sich nehmen würde, scheint nur geringere Betaninkonzentration im Blut vorzuliegen.

T a b e l l e 2

Methoden	Anwendbarkeit und untere Grenze der Methoden
Direkte spektrophotometrische Messung der Seren ohne Vorbehandlung	Nicht anwendbar, da Hämoglobin-Kurve eine mögliche Betaninkurve überdeckt.
Proportionsmethode	Varlierende Hämoglobin-Kurven haben uns von dieser Methode abgebracht.
Säulenchromatographisches Verfahren	Nicht anwendbar, da sich keine eluierbare Betaninzone ausgebildet hat.
Versuche zur Elimination der Oxyhämoglobin-Kurve	22,0 γ /ml
Methode zur Betaninbestimmung in enteweißtem Serum	6,6 γ /ml
Optische Ausschaltung der Hämoglobin-Absorptionskurve	3,0 γ /ml

VI. Literaturverzeichnis

Aiello, M.-Th.

Zur Genetik der Betaninurie
Dissertation Erlangen (1965)

Ainley, A.D. and R. Robinson

Nitrogenous anthocyanins. Part III
Preliminary experiments with betanidin
J.Che.Soz. (London) 446 (1937)

Allison, A.C. and W.G. McWhirter

Two unifactorial characters for which man
is polymorphic.
Nature 178, 748 (1956)

Cramer, F.

Papierchromatographie
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße
S 47, (1953)

Geldmacher- v. Mallinckrodt, M.

Vortrag auf der 8. Tagung der Deutschen
Gesellschaft Anthropologie vom 12.-14.
September 1963 in Köln

Geldmacher- v. Mallinckrodt, M. und K. Mendner
Die Betaninurie: Nachweise und gerichtsmedizi-
nische Bedeutung

Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 1965, im Druck

Harper, H.A.

Review of Physiological Chemistry
S. 132: Lange Medical Publications, Los Altos,
California (1957)

Horwitt, M.K.

Observations on the behavior of anthocyan pigment
from concord grapes in animal body

Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 30, 949, (1933)

Köhler, W.

Über den Farbstoff der Roten Rübe

Dissertation Heidelberg (1953)

Laur, A.

Erythrurie nach Rote Rüben-Genuß

Dtsch. Arch. f. Klin. Med. 196, 466, (1949)

Lehnhardt, E.

Chemische Physiologie

S. 99 und 503

Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1959)

Mendner, K.

Die Betaninurie: Nachweis und gerichtsmedizinische Bedeutung.

Dissertation Erlangen (1965)

Poertzel, Ch.

Zur Frage der erbbiologischen Bedeutung der Ausscheidung
des Farbstoffes der Roten Rübe in Harn.

Dissertation Erlangen (1963)

Pucher, C.W., L.C. Curtis and H.B. Vickery

The red pigment of the root of the beet (*Beta vulgaris*) I.,

The preparation of betanin

J.Biol.Chem. 123, 61, (1938)

Pucher, G.W., L.C.Curtis and H.B.Vickery

The red pigment of the root of the beet (*Beta Vulgaris*) II.,

A Method to determine betanin.

J.Biol.Chm. 123, 71 (1938)

Rein-Schneider

Physiologie des Menschen

S. 321, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1960)

Reznik, H.

Die Pigmente der Centrospermen als systematisches Element
Zeitschr. f. Botanik 43, 499, (1955)

Reznik, H.

Untersuchungen über die physiologische Bedeutung der
chymochrom Farbstoffe

Sitzungsbericht der Heidelberger Akademie der Wissen-
schaften, Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse,
2. Abhandlung, 125 (1956)

Reznik, H.

Die Pigmente der Centrospermien als systematisches Ele-
ment II. - Untersuchungen über das ionophoretische Ver-
halten.

Planta 49, 406 (1957)

Robinson, A.M. und R. Robinson

Synthetical Experiments on the nature of betanin and
related nitrogenous anthocyanins. Part I.

J.Chem.Soc. (London) 1439, (1932)

Saldanha, P.H., O. Frota-Pessoa und L.I.S. Peixoto
Genetik der Betanin-Ausscheidung bei holländischen
Einwanderern in Brasilien

Aus: Second International Conference of Human-Genetic,
Roma, S. 221 (1961)

Schmidt O.Th., P.Becker und M.Hübner

Zur Kenntnis des Farbstoffes der Roten Rübe, III.

Chem. Bericht 93, 1296 (1960)

Schudel, G.

Über die Anthocyane von *Beta vulgaris*

L.(*Rar. repacea* Koch-formca *rubra* L.) und *Raphanus*
sativus L.(*rar.Radicula Pers.*)

Dissertation Zürich (1918)

Watson, W.C., R.C. Luke and J.A. Inall.

Beeturia: Its Incidence and a clue to its Mechanism
Brit. Mech. J. 1963, 19.Okt. Number 5363, P. 971-973

West E.St. and W.R. Todd

Testbook of Biochemistry,

The Macmillan Company, New York, 1956, p. 1227

Wilcox, M.C., H.Wyler, T.J.Mabry und André S. Dreiding

Über die Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin

J.Mitteilung

Helv. Chim. Acta 48, (1965)

Wyler, H., G. Vincenti, M.Mercier, G.Lassie und A.S.Dreiding

Zur Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin,

2. (vorläufige) Mitteilung

Helv.Chim.Acta 42 J. 1696, (1959)

Zindler, G.A., and Colovos

Anthocyanuria and Beetallergy

Ann. Allergy, 8, 603 (1950)

Zum Schluß der Arbeit möchte ich Frau Priv.-Doz.
Dr.Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt für die Über-
lassung des Themas und die ständige Hilfsbereit-
schaft sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.Dr.E.Weinig
für die stete Förderung während der Durchführung
der Arbeit.

Lebenslauf

Ich, Michael Vincent Aiello, wurde als erstes von sechs Kindern des Fabrikanten Thomas Aiello und seiner Ehefrau Mary Aiello, geb. Crisci zu Brooklyn, New York, USA am 20. September 1934 geboren.

Ich erhielt meine Volksschul Ausbildung in den Jahren 1940 bis 1948 an der Ladycliff Academy in Highland Falls, N.Y. Nach erfolgreichem Abschluß besuchte ich die Politechnical Preparatory Country Day School in Brooklyn, N.Y. von September 1948 bis Juni 1952, um die vorbereitende Ausbildung für eine Universität zu erhalten.

Zum Studium an der Jesuiten Universität, Georgetown University, in Washinton D.C. angenommen, schrieb ich mich September 1952 ein und studierte dort bis zur Verleihung des Grades eines Bachelor of Science (Gesamtnote 2⁺) nach vierjährigem Studium (1952 bis 1956). Meine Hauptstudiumsrichtung war in diesen Jahren Englisch und Philosophie. Zu Beginn meines letzten Jahres dort (September 1955 bis Juni 1956) hatte ich mich zum Medizinstudium entschlossen und begann zu jener Zeit die für das Medizinstudium vorbereitende Fächer zu studieren. Diese Vorbereitung dauerte 1 1/2 Jahre und beinhaltete naturwissenschaftliche Fächer; diese Vorbereitung schloß ich mit der Gesamtnote "sehr gut" ab.

Auf Grund dieses Zeugnisses wurde ich zum Medizinstudium an der New York Medical School angenommen und immatrikulierte mich September 1957 dort. Dieses Herbstsemester konnte ich wegen Krankheit nicht beenden und ich mußte mich exmatrikulieren.

Nach Teilnahme an einem Deutsch-Kurs an dem Goethe-Institut wurde ich zum Medizinstudium an der Universität Erlangen-Nürnberg 1958 angenommen. Nach fünf Semestern bestand ich das Physikum an der Universität Erlangen-Nürnberg mit der

Gesamtnote "sehr gut". Im März 1963 begann ich meine
Dissertationsarbeit unter der Führung von Frau Priv.-Doz.
Dr.Dr.Geldmacher- v. Mallinckrodt in der gerichtlichen
Medizin. Am 26. März 1965 habe ich das ärztliche Staats-
examen mit der Gesamtnote "sehr gut" bestanden.

Offsetdruck - Fotodruck

Josef Hogl

8520 Erlangen, Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz,) Tel. 22990

